

***The Impact of PGC-1 α on Engineered Muscle Tissue and the Use of
PET-Scan for Cell Tracking and Functional Analyses***

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

DEANA G. HARALAMPIEVA

M.Sc., University of Konstanz

born on 20.02.1986

citizen of Bulgaria and Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Simon M. Ametamey, examiner

Prof. Dr. Roger Schibli, co-examiner

PD Dr. Dr. Daniel Eberli, co-examiner

Prof. Dr. Christoph Handschin, co-examiner

Prof. Dr. Tullio Sulser, co-examiner

2016

Summary of the PhD thesis

Regeneration of skeletal muscles is a highly-orchestrated process that involves tight regulation of multiple cellular and molecular responses. Extensive studies have examined this process in detail and have shown that muscle precursor cells (MPCs) are an ideal cellular model to study muscle tissue regeneration. As quiescent satellite cells, they have a sub-laminar location in the healthy muscle. External stimuli such as injuries trigger their re-entry into the cell cycle. The MPCs as their progeny proliferate, differentiate and fuse to form new myofibers. In the field of tissue engineering and regenerative medicine MPC-based therapies have been proposed as a novel treatment option for various muscle diseases, including urinary incontinence. Despite the immense progress towards the successful implementation of this cell-therapy, several key aspects still need more investigations: (1) to enhance the survival and metabolism of the injected cells, in order to improve the quality of the bioengineered tissues, (2) to provide tools for non-invasive long-term read-outs of the implanted cells, thereby bypassing multiple harmful biopsies. In this respect, this thesis aimed to find possible solutions to these critical issues, in order to get one step closer towards the successful clinical application of this MPC therapy.

Chapter one of this thesis provides an overview about available non-invasive technologies for imaging applications in tissue engineering and regenerative medicine, focusing on their advantages and drawbacks, recent developments and future implementations. This is followed by a short description of MPCs, their characterisation and therapeutic utility. Furthermore, this section explains the key role of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator α (PGC-1 α) in the coordination of skeletal muscle metabolism and homeostasis. Finally, this chapter closes with a representation of the aims of the project, which are described in detail in the subsequent chapters.

The second chapter describes the first successfully achieved milestones towards the qualitative improvement of bioengineered constructs. The goal was to genetically modify human MPCs (hMPCs) to overexpress PGC-1 α , which is the key regulator of exercise-mediated adaptation, and thereby to enhance early skeletal muscle formation. For this, adenoviral constructs were generated to support the robust and constitutive PGC-1 α expression in the primary cells, which were isolated from patient biopsies and cultured until passage three. The sustained myogenic phenotype of the genetically modified hMPCs was confirmed by immunocytological analysis and flow cytometry. While maintaining their viability and proliferation potential, PGC-1 α modified hMPCs showed an enhanced fiber formation capacity *in vitro*. Only 9 hours after the induction of cell differentiation, an increase in metabolic activity was detected in the genetically modified cells compared to controls as measured by intracellular creatine kinase levels. In nude mice subcutaneously injected with

cell-collagen suspension, earlier myotube formation in PGC-1 α modified hMPCs could be demonstrated as revealed by histological analysis after 1, 2 and 4 weeks. Increased contractile proteins (Desmin, MyHC, MyHC1) levels were detected by Western Blot, suggesting the initial formation of mainly slow twitch oxidative fibers. This enhancement was further corroborated after RTPCR analysis of Desmin and MyHC1 gene expression levels. These results showed that modification of hMPCs to overexpress PGC-1 α stimulated earlier muscle fiber formation *in vitro* and *in vivo*, with an initial switch to oxidative type fibers at 1 week. Thus, we considered overexpression of PGC-1 α as a novel strategy for enhancement of skeletal muscle tissue engineering.

A method to non-invasively monitor hMPCs supplemented with PGC-1 α longitudinally is of high interest therefore, an adenoviral system for the ectopic expression of a signaling-deficient form of a human dopamine 2 receptor (hD2R) was designed. For the non-invasive tracking of the engineered cells positron emission tomography (PET) being the most sensitive clinical imaging modality was used, and hD2R served as a reporter gene. Chapter three of this thesis describes the safety of the adenoviral delivery system, the successful tracking of the genetically modified cells *in vivo* and *in vitro*, and the effective monitoring of their hypoxic environment. First, the gene expression levels of the receptor in hMPCs were evaluated by RTPCR and infection efficiency was visualized by fluorescent microscopy. Then, the non-toxic effect of the viral gene-delivery was visualized by CaAM (cell viability assay), measured by WST-1 (cell proliferation assay) and, finally evaluated by a fiber formation assay. The results of these studies showed no impairment of cell viability, proliferation and differentiation capacities of the infected primary human cells. In addition, their sustained myogenic phenotype was confirmed by flow cytometry and fluorescent microscopy. Specificity of radioligand binding to hD2R-hMPCs was demonstrated *in vitro* with [^{18}F]Fallypride, a well-established D2R ligand, using PET imaging and autoradiography of the harvested tissues, and *in vivo* using biodistribution and PET imaging applying haloperidol as a D2R blocking agent. Additionally, [^{18}F]FMISO uptake for detecting hypoxic environment in the cells was evaluated at 1, 2 and 4 weeks after cell implantation *in vivo*. We detected a significant decrease of [^{18}F]FMISO uptake after the first week, corresponding to the formation of new blood vessels in the bioengineered muscle tissues as suggested by Western blot analysis of vWf protein levels and by RTPCR analysis of VEGF-A gene expression levels. Lastly, the sustained survival of the transplanted cells at 1, 2 and 4 weeks with formation of muscle tissue at the site of injection was confirmed by histological assessment of the harvested tissues. Taken together, these data show that indeed the non-invasive PET tracking of hMPC_hD2R cells and bioengineered muscle tissues is feasible. Moreover, vital information about the exact location and the hypoxic state of the forming tissues over time could be gathered.

As detailed in chapter four, we combined the expertise from the abovementioned studies to image the enhanced cell-driven regeneration in a *Tibialis anterior* (TA) muscle crush injury model. This model for skeletal muscle regeneration leads to a significant loss of muscle functionality, thereby mimicking the situation in patients with stress urinary incontinence (SUI). Addressing the limited long-term capacity of MPCs to heal muscle damages, we utilized the previously established genetically modified hMPC_PGC-1 α to monitor the functional regenerative potential of the proposed cell-therapy and compared it to control hMPC_GFP. The regenerating muscles overexpressing PGC-1 α demonstrated enhanced expression of markers associated with myogenesis (α -actinin, myosin heavy chain 1 and 2, Desmin), vascularization (VEGF), as well as with neuronal (ACHE) and mitochondrial (COXIV) activity. Concomitantly, muscle force measurements by myography revealed a significantly improved contractile force in muscles injected with hPGC-1 α _hMPCs 1-3 weeks after injury, when compared to hMPC_GFP controls. Applying the previously established PET imaging conditions for hMPCs_hD2R using [18 F]Fallypride and [11 C]Raclopride for D2R, and [64 Cu]NODAGA-RGD for neo-vascularization, distinct differences between hMPCs_hD2R_hPGC-1 α and GFP-infected control hMPCs injected in the TA crush injury were observed as reflected in the different signals of the used radiotracers. While tracking the hMPC_hD2R_hPGC-1 α using the high-affinity D2R ligand [11 C]Raclopride, an unspecific tracer accumulation in the hMPC_GFP control injuries was observed leading to the assumption that this signal was most likely due to inflammation. This hypothesis was further confirmed in the regenerating muscles using [64 Cu]NODAGA-RGD, a specific $\alpha_v\beta_{III}$ integrin PET radiotracer. Given that macrophages also express this integrin, we assumed that the recorded signal represented inflammation rather than neovascularization. Immunohistological assessment and gene analysis of harvested regenerating muscles at different time points confirmed the distinct inflammation levels (macrophage accumulation and TNF- α secretion), correlating with the PET signal.

In summary, we were able to facilitate early functional muscle tissue regeneration, thereby introducing a novel approach to further improve cell-based therapies for skeletal muscle tissue engineering. Besides successful tracking of the injected cells in muscle crush injuries, we were able to demonstrate that the specificities of the radioligands are significantly altered in areas with high inflammation, thus addressing a possible bottle-neck of PET imaging of neo-vascularization. Further research is necessary to fully understand the role of PGC-1 α in regeneration enhancement and to validate further radiotracers which are suitable for non-invasive imaging of the cell-based tissue engineering process.

Zusammenfassung des PhD Projektes

Regenerative Medizin mit autologen Zellen wird zukünftig eine Alternative für den Organen- und Gewebeersatz darstellen. Die Nutzung von Muskelvorläuferzellen (Muscle Precursor Cells – MPCs) in autologen Stammzellentherapien für Krankheiten der Skelettmuskulatur scheint vielversprechend. MPCs haben die Fähigkeit, funktionelle Muskelfasern zu bilden. Im intakten, gesunden Muskel befinden sie sich im inaktiven Stadium als Satellitenzellen sublaminar in der Peripherie der Fasern. Durch äussere Einwirkung werden sie erneut aktiviert proliferieren und differenzieren sich zu neuen Muskelfasern. Die Funktionalität von Muskelfasern und –zellen nimmt mit zunehmendem Alter und eingeschränkter Regenerationsfähigkeit kontinuierlich ab. Dies äussert sich auch in einer höheren Stressinkontinenzrate (SUI) bei älteren Menschen. Die Implantation autologer MPCs in den Schliessmuskel der Blase ist eine vielversprechende Therapieoption für diese Erkrankung. Trotz des grossen Fortschrittes der Zelltherapie sind zwei entscheidende Aspekte noch näher zu untersuchen: (1) wie kann die Qualität der zu injizierenden Zellen verbessert werden, um die Regeneration zu fördern? Und (2) wie können Langzeitergebnisse der Stammzelltherapie nicht-invasiv dargestellt werden und somit wiederholte Biopsieentnahmen verhindert werden? Ziel dieses PhD Projekts war die Erstellung eines Lösungskonzepts um der klinischen Umsetzung der MPC-Therapie einen Schritt näher zu kommen.

Das erste Kapitel dieser Arbeit gibt eine Übersicht über verfügbare nicht-invasive Technologien zur Visualisierung von Zelltherapien in der regenerativen Medizin und Gewebezüchtung. Detailliert wird auf Vor- und Nachteile, neue Entwicklungen und zukünftige Realisierungen näher eingegangen. Es folgt eine Beschreibung und Charakterisierung der MPCs mit möglichen therapeutischen Einsatzmöglichkeiten. Zusätzlich wird in diesem Kapitel die Schlüsselrolle des Peroxisom Proliferator-aktivierten Rezeptor- γ Co-Aktivatoren α (PGC-1 α) in der Koordination des Skelettmuskelmetabolismus und der Homöostase erläutert. Abschliessend werden die Ziele der Doktorarbeit definiert, auf welche in den nachfolgenden Kapiteln eingegangen wird.

Das zweite Kapitel beschreibt die ersten Meilensteine zur qualitativen Verbesserung biotechnisch erzeugter Muskelkonstrukte. Die Idee ist, menschliche MPCs (hMPCs) dahingehend gentechnisch zu verändern, dass PGC-1 α überexprimiert wird. Durch seine Schlüsselrolle im Muskelmetabolismus soll dadurch die Skelettmuskelbildung verbessert werden. Dafür wurden adenovirale Konstrukte (mit PGC-1 α und GFP) erzeugt und hMPCs aus Patientenbiopsien isoliert und vermehrt. Der unveränderte Skelettmuskelzellphänotyp der genetisch modifizierten MPCs wurde mittels Durchflusszytometrie und Immunocytochemie bestätigt. Die Viabilität und Proliferationsraten der PGC-1 α

überexprimierenden hMPC wurden nicht beeinträchtigt und entsprachen dem Wildtyp und den GFP-infizierten Kontrollzellen. Jedoch bewirkte die Überexprimierung von PGC-1 α eine signifikante Erhöhung der Faserbildungskapazität *in vitro*. Schon 9 Stunden nach der Induktion der Differenzierung wurde eine Steigerung der metabolischen Aktivität in den genetisch veränderten Zellen gemessen. Dies wurde durch erhöhten Spiegel der intrazellulären Creatinkinase (CK) angezeigt. Für die *in vivo* Experimente wurden die Zell-Kollagen-Suspensionen subkutan in Nacktmäuse injiziert, die daraus biotechnisch erzeugten Gewebe wurden nach 1, 2 und 4 Wochen wieder entnommen. Histologische Analysen zeigten eine schnellere Muskelfaserbildung bei PGC-1 α infizierten Muskelvorläuferzellen. Dies wurde auch in Proteinanalyse mittels Western Blot ersichtlich, bei welcher erhöhte Desmin, MyHC und MyHC1 Spiegel festgestellt wurden, was zusätzlich auf eine primäre Umschaltung auf oxidative Muskelfasertypen hinwies. Diese Erhöhung von Desmin und MyHC1 wurde zusätzlich mittels RTPCR Genanalyse nachgewiesen. Durch die frühere Muskelfaserbildung *in vitro* und *in vivo* mit einer primären Umschaltung zu oxidativen Fasern kann die Überexpression von PGC-1 α in hMPCs als eine neuartige Strategie zur Verbesserung der Muskelgewebebezug betrachtet werden.

Im Kapitel drei dieser Arbeit wurde eine nicht-invasive Methode zur Verfolgung von hMPCs nach Implantation entwickelt. Dazu wurde ein adenovirales Konstrukt hergestellt, welches die Expression eines mutierten Dopamin D2 Rezeptor (D2R) mit mangelnder intrazellulärer Signalwirkung in hMPCs erlaubt. Nach der Gewinnung und Vermehrung der Patientenzellen wurden diese infiziert, sodass sie den hD2R exprimieren, welcher mit einem bereits klinisch erprobten Positronen Emissions Tomographie (PET) Tracer dargestellt werden kann. Zuerst wurde die erfolgreiche Zelltransduktion durch RTPCR und Fluoreszenzmikroskopie geprüft. Weiter wurde untersucht, ob die genetisch veränderten Muskelvorläuferzellen ihren Phänotyp verändert haben und ob sie weiterhin normale Muskelfasern bilden können. Dies wurde mittels Viabilitäts- (CaAM), Proliferations- (WST-1), Immunozytochemische Untersuchungen und Durchflusszytometrie, sowie Faserbildungsassay (FFA) experimentell nachgewiesen. Die anschließende Anwendung eines nicht-invasiven „PET-imagings“ lieferte weitere Erkenntnisse bezüglich Überlebensrate der Zellen und Bindungsspezifität des etablierten hD2R Radioliganden [^{18}F]Fallypride. Die Spezifität wurde *in vitro* mittels PET Visualisierung der infizierten Zellen und Autoradiographie der geernteten Gewebekonstrukten und *in vivo* mittels Biodistribution und PET mit Haloperidol-induzierte hD2R Blockierung, nachgewiesen. Die exakte Lokalisation des neu entwickelten Muskelgewebes *in vivo* konnte mit [^{18}F]Fallypride erfolgreich veranschaulicht werden. Zusätzlich wurde das [^{18}F]FMISO Signal via PET detektiert, um die Veränderungen des hypoxischen Zellmilieus *in vivo* 1, 2 und 4 Wochen nach der Implantation darzustellen. Dabei wurde nach der ersten Woche eine signifikante Signalabnahme von [^{18}F]FMISO detektiert,

welche der Neoangiogenese im biotechnologisch entwickelten Muskelgewebe entspricht. Die Entstehung von Blutgefäßen wurde durch Western Blot Analyse der vWf Proteinmenge und durch RTPCR Analyse von VEGF-A in den entnommenen Geweben über vier Wochen nachgewiesen. Zum Schluss wurde die erfolgreiche Muskelfaserbildung nach subkutaner Zellinjektion histologisch nachgewiesen. Zusammenfassend hat dieser Teil des Projektes neuartige Einblicke in das Gebiet der Muskelregeneration und des Zellmetabolismus erlaubt und einen Beitrag zur nicht-invasiven Visualisierung biotechnologisch entwickelter Muskelgewebe geleistet, welcher für die zukünftigen klinischen Anwendungen entscheidend sein kann.

Im Kapitel vier wurden die oben beschriebenen Methoden kombiniert, um die verbesserte, durch Zellinjektionen unterstützte Muskelregeneration in einem Druckverletzungsmodell des *Tibialis anterior* (TA) nicht-invasiv darzustellen. Dieses Modell imitiert mit einem bedeutenden Verlust der Muskelfunktionalität die Situation in stressinkontinenten Patienten. In diesem Teil des Projektes wurde die Nachhaltigkeit der Behebung von Muskelschäden mittels hMPCs untersucht. Dafür wurden die genetisch veränderten hMPC_PGC-1 α verwendet um eine funktionelle Verbesserung der vorgeschlagenen Zelltherapie zu stimulieren. Als Kontrolle wurden hMPC_GFP verwendet. Die Analyse der PGC-1 α überexprimierenden Muskeln deutete auf eine erhöhte Myogenese (α -actinin, MyHC1 und 2, Desmin), Vaskularisation (VEGF), sowie neuronale (ACHE) und mitochondriale (COXIV) Aktivität hin. Gleichzeitig zeigte die mittels Myographie gemessene Muskelkontraktion der mit hPGC-1 α injizierten Muskeln eine, im Vergleich zu den mit hMPC_GFP injizierten Kontrollen, signifikant verbesserte Kontraktionskraft in den Wochen 1-3 nach der Verletzung. Mit den etablierten PET Bildgebungsverfahren für hMPCs_hD2R mittels [^{18}F]Fallypride und [^{11}C]Raclopride (für D2R) und [^{64}Cu]NODAGA-RGD (für Neovaskularisation) konnten klare Unterschiede zwischen hMPCs_hD2R_hPGC-1 α und hMPC_GFP injizierten Zellen nachgewiesen werden. Dies spiegelte sich in den unterschiedlichen Signalen der benutzen radioaktiven Tracer wieder. Die unspezifische Ansammlung des D2R Liganden [^{11}C]Raclopride in den Kontrollverletzungen führte zur Annahme, dass das Signal durch eine Entzündung verursacht wurde. Diese Hypothese wurde während des Imagings der Neovaskularisation im regenerierenden Muskel mittels [^{64}Cu]NODAGA-RGD, einem spezifischen $\alpha_v\beta_{III}$ Integrin PET Radiotracer, bestätigt. Da Makrophagen das Integrin ebenfalls exprimieren, folgerten wir, dass das Signal eher auf eine Entzündung als auf Neovaskularisation zurückzuführen ist. Immunohistologische und genetische Untersuchungen der regenerierenden Muskeln zu verschiedenen Zeitpunkten haben Entzündungen (Ansammlung an Makrophagen und TNF- α Sekretion), in Übereinstimmung mit dem PET Signal, bestätigt.

Zusammengefasst konnten wir die funktionelle Regeneration von Muskelgewebe ermöglichen und somit einen neuen Ansatz zur Verbesserung zellbasierter Therapien für die

Skelettmuskelgewebebezug entwickeln. Neben einem erfolgreichen Tracking der injizierten Zellen in den regenerierenden Muskeln konnten wir aufzeigen, dass die Spezifitäten der Radioliganden in entzündetem Gewebe signifikant verändert werden, wodurch eine mögliche Beeinträchtigung der PET Bildgebung der Neovaskularisation hervorgeht. Um die Rolle von PGC-1 α in der Verbesserung der Regeneration vollständig zu verstehen, sowie zur Validierung weiterer Radiotracer für nicht-invasives Monitoring zellbasierter Therapien ist weitere Forschung nötig.